

取扱説明書

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。

*右記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認のうえ操作して下さい。→<http://ak-j.jp/>

【測定原理】

本法は 3-5 DiBr-PAESA と銅とのキレート錯体形成による可視部の発色を観測し銅を求めるものです。セルロブラスミン、及びタンパク質に結合した銅を、弱酸、変性剤により解離させ、銅-3-5 DiBr-PAESA 錯体を形成させます。この銅キレート錯体を波長 580nm で測定することにより銅濃度を求めることができます。

【亜鉛定量の意義】

銅を含むタンパク質の主な役割は酸化還元機能です。現在知られている、銅を含む酵素の殆どが分子状酸素と直接反応します。プラズマ中の銅のおよそ 95%は α -2-グロブリン、セルロブラスミン、フェロキシダーゼ活性を持つ酸化酵素と結合しています。銅の欠乏に関連する病気として、心臓疾患、骨粗しょう症、骨関節炎、Menkes 症候群、ウイルソン病などがあります。また、生体内の酸化機能の低下についても報告されています。一方、過剰の銅は有毒となります。

【キットの内容】

合計 200 測定分 (商品コード：CU01M)

R-A 緩衝液	50 mL×1
R-B アスコルビン酸ナトリウム (粉末)	60 mL ボトル×1
R-R キレート試液 3,5-DiBr-PAESA	1.1 mL×1
銅標準液 200 µg/dL	1.6 mL×1

【測定試料の注意点】

- 測定試料が強酸の場合は、pH 2 以上にしてからアッセイ検体としてください。試料種によって pH 緩衝力が異なる場合があるので pH を確認し、酸添加量の最適化を推奨しています。
- 懸濁や着色している試料を用いる場合は、主波長の吸光度から副波長の吸光度を差分した吸光度を用いて濃度を求めてください。
- 著しく懸濁している場合は遠心分離等で懸濁物を除去したものをアッセイ検体としてください。
- 測定レンジ以上の検体は適当に希釈したものをアッセイ検体としてください。または多点検量線から濃度を求めて下さい。
- 本法は、その得られる数値を保証するものではありません。予め特性を確認した後、応用される際は最適パラメータを試料種ごとに検討の上、ご使用されることをお奨め致します。
- EDTA は測定値へ影響を与えるため使用しないで下さい。

【オペレーション】

1. 試薬の準備 (用事調製)

以下の用量で R-A、R-B、R-R を清浄な容器へ分注し、発色液を調製して下さい。

R-AB 緩衝液の調製

R-A 緩衝液の全量を R-B ボトルへ添加し、R-B 中の粉末を十分に溶解させて下さい。これを R-AB 緩衝液とします。

*R-A 緩衝液は必ず常温にしてから使用して下さい。(冷蔵時に界面活性剤が沈殿していることがあります。しばらく常温で静置するか、ボトルを 50℃以下の湯に浸すことで沈殿成分は溶解します。)

発色液の調製 *発色液は調製後、2 日以内に使用してください。

測定検体数	1 検体あたり	(例) 100 検体
R-AB 緩衝液	230 (µL)	23 (mL)
R-R キレート試液	5 (µL)	0.5 (mL)

測定検体数に応じて必要量を用事調製

銅標準液

そのまま使用して下さい。

2. 試料の調製

更新・最新情報は弊社 website を参照してください。

◇血清・血漿
そのままアッセイ検体として下さい。
◇組織抽出液、ライセート、その他の試料
塩酸、硝酸等を試料に添加し 0.01~0.1M 程度の酸試料とする。 (例：試料 1mL + 6M 塩酸 10µL) ↓ pH > 2 であることを確認しアッセイ検体とする。 *懸濁している場合は遠心分離による上清をアッセイ検体とする。

*パラメータは一例です。試料、目的に合わせて最適化して下さい。

*アッセイに適用できる検体は pH > 2 です。

3. アッセイと測定操作

プレートリーダー（紫外可視分光光度計）による定量（1 検体 242 μL 容量）

以下の用量で発色液、標準液、試料をウェルへ分注し、10 分後に下記の測定条件でマイクロプレートリーダー（紫外可視分光光度計）により測定してください。

○アッセイ

添加する試薬・試料（μL）	アッセイ検体		
	試薬ブランク	銅標準試料	試料
発色液	230	230	230
精製水	12		
銅標準液		12	
試料			12
十分に混合し、室温 10 分後、所定波長の吸光度を測定			

*ビベッティングにより泡が発生しないように丁寧に混合してください。泡が発生した場合はプレートミキサー等により除去してください。プレートミキサーのみによる混合、攪拌では再現性不良が発生する場合があります。
*標準液の濃度はカットオフ値、目的に合わせて、選択してください。
但し 400 μg/dL 以上の試料では 2 倍～10 倍希釈したものをアッセイ検体としてください。
アッセイボリュームを変更する場合は上記割合でアッセイして下さい。

測定条件（マイクロプレートリーダー）

測光波長（主波長）	580 nm（吸収極大波長）
感度のある波長域	570～590 nm
測定温度	25～37℃
ウェル	96 穴ウェル or 分光測定用セル等
*補正波長（副波長）	680～750 nm

*紫外可視分光光度計を使用してキュベットで測定する場合、測定可能な検体数はマイクロプレートリーダー使用時と比較して少なくなります。ダウンサイズされた微量セルを使用することで 96 穴ウェルと同等の測定数を得ることも可能です。詳細については、弊社 website のサポート情報「紫外可視分光計 微量セル推奨品」を御参照下さい。微量セルはセルホルダーとのクリアランスの僅差による誤差、再現性の低下などが報告されています。使用時にはセルホルダーへ均一に装着されていることを十分に確認してください。
*懸濁試料の場合、主波長の吸光度から副波長の吸光度を差分した値を OD 値として濃度を算出することで、より一層の正確性を付与させることができます。
*タンパク質低吸着タイプのウェルを使用してください。

○濃度の算出

$$\frac{\text{OD}_{\text{試料}} - \text{OD}_{\text{ブランク}}}{\text{OD}_{\text{標準}} - \text{OD}_{\text{ブランク}}} \times 200 = \text{亜鉛濃度}(\mu\text{g/dL})$$

標準液濃度

OD_{試料} : 試料の吸光度
OD_{標準} : 標準試料の吸光度
OD_{ブランク} : 試薬ブランクの吸光度

単位換算 $\mu\text{g/dL} \times 0.157 = \mu\text{mol/L}$

【主な仕様と性能】

感度	試薬をブランクとして銅標準液（200 μg/dL）を測定した時の ΔOD は 0.1～0.3 の範囲内です。
同時再現性	同一検体を 5 回測定した時の CV は 5%以内です。
正確性	既知濃度の血清標準物質における表示値との差は 10%以内です。
測定範囲	3～400 μg/dL
共存物質の参考許容範囲	抱合型ビリルビン・非抱合型ビリルビン 15 mg/dL トリグリセリド 1000 mg/dL ヘモグロビン 0.5 g/dL

【品質保持期限と保存方法】

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。（冷蔵 2～8℃）
開封後、冷暗所（2-8℃）で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

【参考文献】

Abe, A., Yamashita, S., Noma, A., (1989) *Clin. Chem.*, 552-554.
Makino T., Kiyonega. *Clin. Chem. Acta*, 171,19 (1988)

【製造販売業者】

AKJ グローバルテックノロジー 株式会社
千葉市中央区中央 4-5-1 Qiball 14F

※Metallogenics™およびメタロジェニックス™は、AKJ グローバルテックノロジー（株）の試薬販売ブランドです。
※メタロアッセイ™は、AKJ グローバルテックノロジー（株）の試薬キットの名称です。

問い合わせ先

AKJ グローバルテックノロジー株式会社 営業部
〒260-0013 千葉市中央区中央 4-5-1 Qiball 14F
TEL : 043-227-6767
FAX : 043-227-6768
e-mail : sales@ak-j.com
URL: <http://ak-j.jp/>

※ 取扱説明書、測定プロトコル等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーで御確認下さい。
<http://ak-j.jp/>
※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではありません。あらかじめご了承下さい。
※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダー、紫外可視分光光度計を用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
※ 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No. を御確認の上、お問い合わせ下さい。
※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコルは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。
※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。